

23. Agroalimentario

Aplicación de un Enfoque Metagenómico al Estudio de la Diversidad Bacteriana asociada a Suelo, Rizósfera y Vinos de la Región Bonaerense Argentina

Autor: Rivas, Gabriel Alejandro; e.mail: rivasalejandro227@hotmail.com

Orientador: Delfederico, Lucrecia; e.mail: ldelfe@unq.edu.ar

Departamento de Ciencia y Tecnología

Universidad Nacional de Quilmes

Resumen

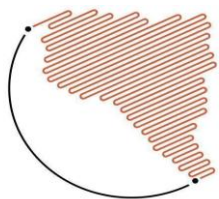
Durante la fermentación maloláctica (FML) las bacterias del ácido láctico (BAL) decarboxilan el ácido L-málico transformándolo en ácido L-láctico y contribuyen a la calidad del vino al reducir su acidez y aportar a su aroma y sabor. De este modo, las BAL aportan al *terroir* característico de cada vino, y su diversidad en el viñedo dependerá de factores como clima, suelo, varietal vínico y prácticas culturales y de vinificación. En la región vitícola bonaerense (Argentina) no existen aún estudios sobre la diversidad microbiológica asociada a suelos, vides, mostos y vinos, conocimiento crucial para seleccionar cepas indígenas con fines enológicos. Para iniciar este análisis se realizó la secuenciación masiva del gen *16S rRNA* de muestras de suelo, rizósfera, mosto y vinos de dos bodegas del SO bonaerense (Saldungaray y Al Este, Buenos Aires, Argentina), obteniéndose 123.379 secuencias y 5.323 OTUs. Se observaron índices de diversidad elevados, con diferencias significativas entre muestras de suelo y rizósfera respecto de mosto y vino. Los análisis taxonómicos mostraron como filo mayoritario en suelo y rizósfera a *Proteobacteria* (especialmente *Alphaproteobacteria*, con predominancia de *Rhizobiales*), y en mosto y vino a *Proteobacteria*, con predominancia de las *Alphaproteobacteria Rhodospirillales* y *Sphingomonadales*. Estos hallazgos, constituyen un primer aporte al conocimiento de las comunidades bacterianas de una región vitivinícola en desarrollo y contribuirán a optimizar procesos productivos y prácticas agrícolas sustentables.

Palabras Claves: Diversidad bacteriana, secuenciación masiva, *terroir*

Introducción

La vinificación involucra dos fermentaciones sucesivas, una primaria o alcohólica (FA), llevada a cabo por levaduras, y una secundaria o maloláctica (FML), conducida

por bacterias del ácido láctico (BAL), principalmente *Oenococcus oeni* y *Lactobacillus plantarum*, que consiste en la conversión del ácido L-málico en ácido L-láctico y CO₂. La FML juega un rol



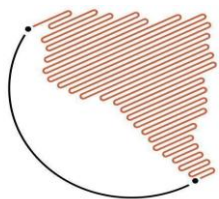
importante, especialmente en la producción de vinos tintos, generando una deacidificación que conduce a la estabilidad microbiológica por remoción del malato como potencial fuente de energía. Desde el punto de vista organoléptico, el metabolismo de las BAL provoca cambios en los contenidos de diversos compuestos orgánicos que contribuyen a modificar el aroma y mejoran la calidad del producto. En particular, las actividades enzimáticas como β -glucosidasa con capacidad de hidrolizar glicoconjugados no volátiles presentes en la uva, liberando así compuestos aromáticos, esterasas, proteasas, enzimas involucradas en el metabolismo del citrato y en la degradación de ácidos fenólicos (Swiegers et al. 2005, Lerm et al. 2011, Iorizzo et al. 2016).

En Argentina, las prácticas tradicionales de vinificación fomentan las FML espontáneas, conducidas por la microbiota nativa, para realzar la tipicidad regional de los vinos. Sin embargo, la falta de predictibilidad de los procesos naturales, sumado a los riesgos de paradas de fermentación y de contaminación microbiana, puede incidir negativamente en los costos de producción. Por esto, el empleo de cultivos iniciadores desarrollados con cepas autóctonas de cada región vitivinícola es hoy una práctica internacional muy extendida, por su mejor adaptación al proceso de vinificación y por mantener la tipicidad regional.

El concepto de *terroir* reviste suma

importancia en vitivinicultura, ya que relaciona los atributos sensoriales del vino con las condiciones ambientales del viñedo. Se lo puede definir como un ecosistema interactivo en un determinado ambiente, que incluye clima, suelo y planta, así como las técnicas locales de viticultura y vinificación. Se ha demostrado que los factores geográficos, de variedad de uva y climáticos dan forma a las comunidades de bacterias y hongos de las uvas, a través del tiempo de cultivo de las vides (Bokulich et al. 2013, 2014) y que existen diferencias genéticas significativas entre comunidades microbianas de diferentes localizaciones geográficas, que afectan diferencialmente el fenotipo del vino (Knight et al. 2015). Se ha estudiado también el rol que las interacciones microbianas juegan en la sanidad de la vid, la calidad del fruto y del vino (Barata et al. 2012).

La vitivinicultura bonaerense constituyó una pujante agroindustria hasta mediados del s. XX (Ospital, 2003), resultando finalmente relegada por motivos económicos, políticos y sociales. Desde principios de los 2000 se ha iniciado su recuperación a través de emprendimientos que hoy muestran distinto grado de desarrollo. En la prov de B Hay 49 viñedos, con 145 ha cultivadas, que representan el 0,2% del total de viñedos registrados y el 0,07% de la superficie cultivada de vid en Argentina. Hasta el presente no existen estudios sobre la diversidad biológica de suelos asociados a vides, mostos y vinos de la región vitícola



bonaerense y todo programa de selección de cepas indígenas de BAL con fines enológicos implica conocer la extensión y diversidad de la biota autóctona con la cual la cepa/s seleccionada/s deberá/n competir. Se propone iniciar el análisis de esa diversidad aplicando, en una primera etapa, métodos metagenómicos y bioinformáticos para estudiar la microbiota de suelo, rizósfera, mostos y vinos en viñedos y bodegas del SO bonaerense. Posteriormente, y con vistas a la formulación de cultivos malolácticos nativos, capaces de contribuir a la expresión del *terroir* diferencial de estos vinos, se realizarán aislamientos de las especies de BAL predominantes en FML espontáneas y exitosas. Los mismos serán identificados, tipificados y caracterizados enológica y tecnológicamente para luego seleccionar aquellas cepas con capacidad de llevar a cabo una FML controlada. Finalmente se evaluarán las estrategias de implantación en mosto y vino y el desempeño de las cepas en cada caso, en ensayos de vinificación a escala de laboratorio. La propuesta integra un proyecto general orientado al diseño de cultivos malolácticos formulados con cepas de BAL indígenas de diferentes regiones vitivinícolas del país, y la búsqueda de las condiciones óptimas de empleo para la obtención de vinos de calidad diferenciada.

Mediante metodologías de secuenciación masiva (*high-throughput sequencing*) y cromatografía líquida de ultra alta performance (UHPLC/QTOF MS), Bokulich et

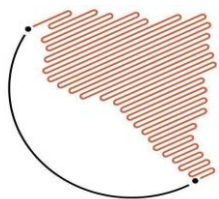
al. (2016) probaron que los consorcios de hongos y bacterias involucrados en las fermentaciones vínicas, correlacionan con la composición química de los vinos terminados y permiten predecir la abundancia de metabolitos en los mismos. Los estudios metagenómicos, fundamentalmente la secuenciación basada en *amplicones* de marcadores filogenéticos (secuencias parciales de los genes *16S rRNA* en bacterias y arqueas, o *18S rRNA* en eucariotas, o del espaciador interno transcripto - ITS, en hongos y levaduras), que se complementan con estudios transcriptómicos (secuenciación de cDNA) y tecnologías funcionales como proteómica y metabolómica, brindan información no sólo de la estructura de la comunidad (riqueza de especies, diversidad y distribución) sino también de la función potencial de la misma.

Objetivos

El objetivo general del trabajo fue iniciar la caracterización de la diversidad de la microbiota procariota de suelos y rizósfera asociada a vides y vinos del varietal Malbec, en dos bodegas del SO de la provincia de Buenos Aires, Argentina y analizar la posible correlación entre las poblaciones de bacterias y arqueas presentes en suelo y rizósfera, con las presentes en los vinos.

Materiales y Métodos

Recolección de muestras: Suelo y rizósfera: Se tomaron muestras del varietal Malbec, de las bodegas Saldungaray y Al



Este, 2 a 3 semanas previas a la vendimia 2017. Se ingresó al interior de las parcelas para realizar la recolección a 20-30 cm de profundidad a partir de la base de 3 plantas, dejando una planta por medio. A su vez, hilera por medio, se volvió a repetir 2 veces más, obteniendo 9 muestras, que se agruparon aleatoriamente de a tres, logrando así los triplicados biológicos.

Vino: Las muestras se tomaron durante el proceso fermentativo, obteniéndose así mosto, fermentación alcohólica final y fermentación maloláctica, correspondientes al varietal Malbec, de la vendimia 2017. Para la vendimia 2018, debido a las condiciones climáticas desfavorables, sólo se logró obtener una muestra de mosto para elaboración de Champagne, conformada por una mezcla de varietales Pinot Noir, Chardonnay, Sauvignon y Malbec.

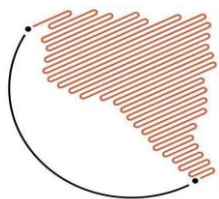
Procesamiento de las muestras: Los triplicados biológicos de suelo se procesaron para separar las raíces de la tierra, en condiciones asépticas, y luego obtener la tierra circunscripta a las raíces (rizósfera). Por otra parte, se alicuotaron 35 mL de cada muestra de vino en *falcons*, se centrifugaron 15' a 8000 rpm, y los pellets fueron lavados con buffer Tris-EDTA (TE) (20:2 mM).

Extracción de DNA genómico: El DNA genómico total fue extraído mediante el kit FastDNA Spin Kit for Soil (MP biomedical). Para las muestras de suelo y rizósfera, se llevó a cabo el protocolo descrito por el kit (Ospital, M. S. et al. 2003). En el caso de las

muestras de vino, la etapa de lisis de dicho procedimiento no fue exitoso y debió modificarse. Dell pellet lavado con buffer TE, y resuspendido en buffer PBS, se colocó 1 mL en tubos Eppendorf con *beads* (provistos por el kit), y se realizó la lisis en diferentes condiciones: A. Tratamiento con lisozima 30' a 37°C y ciclo de 40" de bead beater. B. Tratamiento con lisozima 35' a 37 °C, agregado de buffer de Lisis MT (provisto por el kit), y ciclo de 10" de *bead-beater*. C. Buffer de Lisis MT, un ciclo de 5' de *bead-beater*, e incubación con lisozima 30'. D. Buffer de Lisis MT, dos ciclos de 1' 30", con incubación de 2' de hielo entre cada ciclo. E. Buffer de Lisis MT, dos ciclos de 1' 30", con recuperación de sobrenadante entre ciclo. F. Buffer de Lisis MT, dos ciclos de 1' 10", con recuperación de sobrenadante entre ciclos.

El DNA obtenido se visualizó en un gel de agarosa 1%, teñido con bromuro de etidio (0,5 mg/mL), en presencia de un *ladder* de 400 pb y otro de 1 Kpb, para controlar su grado de integridad. Mediante un equipo Nanodrop (NanoDrop® ND-1000 Thermo Scientific) se determinó la absorbancia de cada muestra, conservando aquellas con concentración superior a 20 ng/μL, y relación 280/260 > 1.7.

Secuenciación: Las muestras se enviaron a MacroGen Korea (Seoul, Rep de Korea) donde se preparó la biblioteca para amplicones (*Herculase II Fusion DNA Polymerase Nextera XT Index Kit V2*), y se realizó la secuenciación apareada (*paired-*



ends) de la región hipervariable V3-V4 del gen de 16S *rRNA*, mediante Illumina (MiSeq), con amplicones de 301 pb de longitud.

Análisis Bioinformático: Las secuencias crudas fueron demultiplexadas, depuradas según calidad y analizadas mediante QIIME2-2019.4 (Bolyen, E. et al. 2018). Las secuencias quiméricas se filtraron y los extremos se trataron con el plugin q2-DADA2 (Callahan, B. J. et al. 2016.), eliminando las regiones de baja calidad. Las secuencias correspondientes a DNA mitocondrial y cloroplástico se depuraron mediante los plugins “*qiime taxa filter-table*” y “*qiime taxa filter-seqs*” (McDonald, D. et al. 2012).

Utilizando el plugin “*qiime diversity*”, se obtuvieron los parámetros de estimación de diversidad tanto alfa (intra muestra) como beta (entre muestras): Unidades Taxonómicas Operativas observadas (OTUs), índice de diversidad de Shannon; y matrices de distancia según la métrica de fracción única (UniFrac) no-ponderado. Los análisis mencionados se realizaron a dos profundidades de muestreo (PM): 920, incluyendo así las secuencias de vino, suelo y rizósfera en un mismo análisis; y 7738, excluyendo las secuencias correspondientes a muestras de vino. La significancia de los resultados obtenidos para la diversidad beta se evaluó mediante el método PERMANOVA (test pseudo-F), con 999 iteraciones de permutación, mientras la correspondiente a resultados de diversidad alfa se evaluó por el método no-paramétrico de Kruskal-Wallis

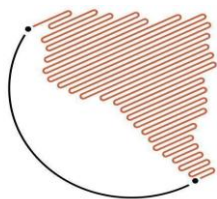
(Kruskal, W. H., & Wallis, W. A. 1952).

La evaluación de la profundidad de muestreo se realizó mediante curvas de rarefacción, obtenidas con el plugin *qiime diversity alpha-rarefaction* de QIIME2-2019.4.

Por último, el análisis taxonómico se realizó con la versión 13_6 del clasificador Greengenes (McDonald, D. et al. 2012, DeSantis, T. Z. et al. 2006), el plugins “*qiime feature-classifier classify-sklearn*” (Bokulich, N. A. et al. 2018, Pedregosa, F. et al. 2011), graficando con “*qiime taxa barplot*”.

Resultados y Discusión

Se analizaron un total de 16 muestras, 12 de suelo y rizósfera (2 bodegas, con triplicados biológicos para cada una), de cultivares Malbec (bodegas Saldungaray, Saldungaray, y Al Este, Médanos, Provincia de Buenos Aires, Argentina), y 3 muestras de vino (vendimia 2017, y una de mosto (vendimia 2018, bodega Saldungaray), a partir de las cuales se obtuvo DNA total. Para optimizar la eficiencia del kit utilizado y obtener DNA genómico poco degradado, se probaron diferentes métodos de extracción. Con las muestras de suelo y rizósfera, se siguieron las indicaciones del fabricante. En el caso de las muestras de vino, se concentraron y se optimizó la recuperación de DNA genómico total, a fin de obtener la mayor cantidad de secuencias posibles. Las estrategias A, B, C y E condujeron a muestras de DNA degradado, mientras que con la estrategia D se obtuvo un DNA genómico total de buena



calidad y con mayor concentración, la estrategia F, permitió obtener DNA de calidad similar, pero con menor concentración. Por ello, se seleccionó el proceso de lisis descrito por la estrategia D.

Diversidad: Para caracterizar la diversidad de la microbiota de bacterias y arqueas presentes en las muestras de suelos, rizósfera y vinos, se utilizó un enfoque independiente de cultivo. Se realizó la secuenciación masiva de la región variable V3-V4 del gen *16S rRNA*, como marcador de la comunidad procariota, obteniendo un total de 123.379 lecturas (libres de secuencias quiméricas y de DNA cloroplástico y mitocondrial) que superaron los filtros de calidad, con valores lecturas/muestra mínimo de 920 y máximo de 14270; y un total de 5323 OTUs.

Mediante el análisis de curvas de rarefacción se estudió la profundidad de secuenciación.

La estabilización de las curvas (en este caso, OTUs observadas), indica que la muestra se acerca a su saturación (Rodríguez & Konstantinidis, 2014) y que la profundidad de secuenciación resultó adecuada para caracterizar las poblaciones procariotas, proporcionando una buena cobertura de las comunidades y asegurando una adecuada representación de diversidad y clasificación taxonómica en los resultados (**Figura 1**).

Antes de efectuar los análisis de diversidad se realizaron dos sub-muestreos, con el objeto de obtener resultados comparables estandarizando de manera aleatoria un número de secuencias fijo para cada muestra. Estos sub-muestreos se efectuaron a dos niveles de profundidad, con la finalidad de analizar la diversidad entre las muestras más semejantes, como suelo y rizósfera (PM de 7738) y de estudiar la semejanza o disimilitud entre este grupo con las muestras

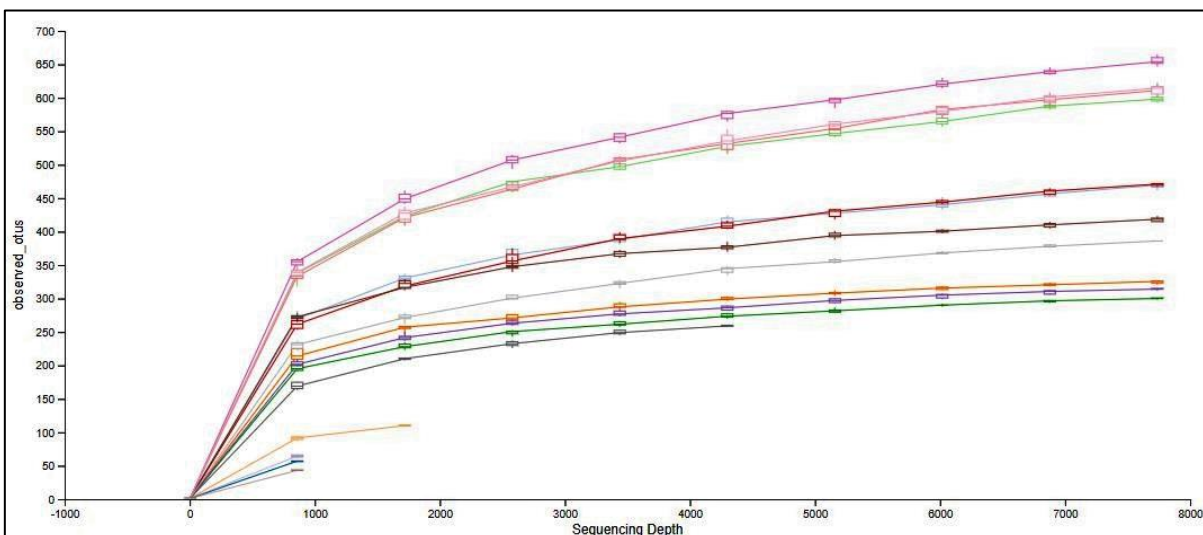
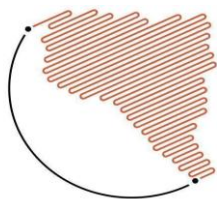


Figura 1: Análisis de rarefacción de estimaciones de riqueza en las comunidades microbianas evaluadas.



de vino, de las cuales se obtuvo menor cantidad de secuencias (PM de 920, para incluir a todas).

Se realizó, por un lado, un análisis de diversidad alfa, referida la diversidad de una unidad, muestra, ensamblaje o hábito (Rosenzweig, M. L. 1995) definidos, y que se suele describir como la riqueza de OTUs; y por otro, se comparó la diversidad entre las comunidades a lo largo de gradientes, y/o separadas por tiempo y espacio, análisis comúnmente conocido diversidad beta (Whittaker, R. H. 1960).

La riqueza (número de OTUs) se evaluó mediante el índice de Shannon (Shannon, C. E., & Weaver, W. 1949)., que considera el

número de especies únicas y su abundancia relativa dentro de cada muestra (**Figura 2**). Con PM de 920 lecturas, se obtuvo menor cantidad de OTUs totales que con PM 7738, debido a la menor cantidad de secuencias para el análisis. En el primer caso, se obtuvo un máximo de 366 OTUs y un mínimo de 44; y en el segundo, un máximo de 656 OTUs y un mínimo de 301 (**Figura 2 A y C**). En ambos muestreos, el número de OTUs en las muestras de vino fue significativamente menor que en suelo y rizósfera ($p < 0.05$), diferencia atribuida principalmente a que en el proceso fermentativo sólo un grupo minoritario de microorganismos sobrevive a las condiciones adversas del mismo (elevada concentración de etanol, presencia de SO_2 ,

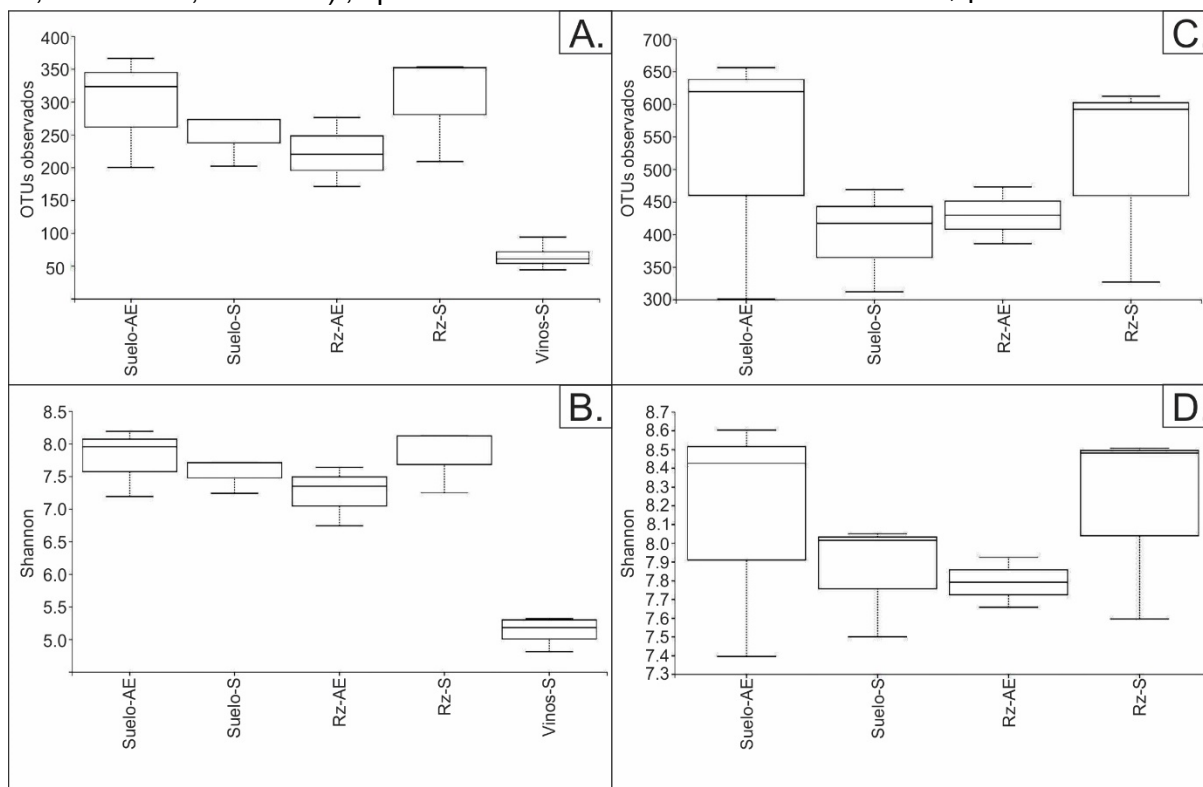
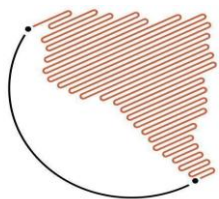


Figura 2: Análisis de valores de Riqueza e índice de diversidad de Shannon. **A. y B.** Profundidad de muestreo de 920, incluyendo todas las muestras de vino, suelo y rizosfera. **C. y D.** Profundidad de muestreo de 7738, suelo y rizósfera de ambas bodegas.

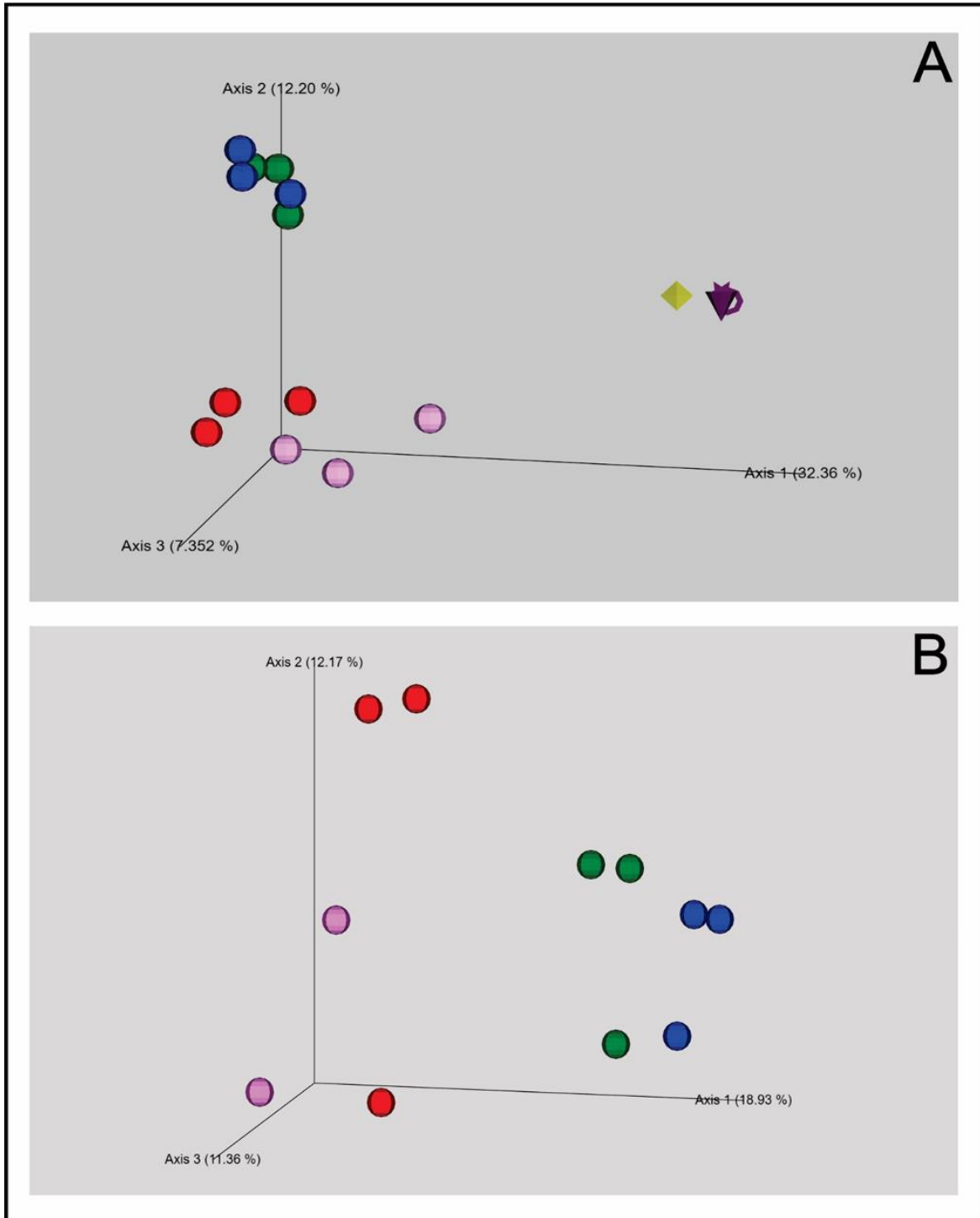
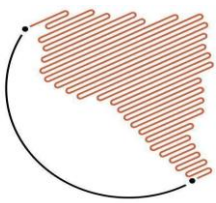


escasez de nutrientes, etc). Por otra parte, el elevado índice de diversidad de Shannon, evidenciado en las muestras de suelo y rizósfera, da cuenta de la riqueza y equidad interna de las mismas en comparación con las de vinos, afectadas por el sesgo mencionado (**Figura 2 C y D**).

Para comparar la estructura de poblaciones microbianas procariotas entre las distintas muestras, se analizó la diversidad beta, utilizando UniFrac no-ponderado, que consiste en medir la distancia filogenética entre conjuntos de taxones de un árbol filogenético como la fracción de la longitud de la rama del árbol que conduce a los descendientes de un entorno u otro. La medida calculada representa la cantidad total de evolución que es única para cada estado. El operón rRNA se utiliza como marcador filogenético de la cantidad relativa de evolución de esas secuencias (Lozupone, C. et al. 2005). Se calcularon las distancias en los perfiles taxonómicos de cada una, obteniendo una matriz de distancias entre todas las muestras, a las dos PM evaluadas (920: suelo, rizósfera y vino / 7738: suelo y rizósfera). La similitud/disimilitud se evaluó aplicando la métrica de UniFrac no-ponderada que permitió obtener la distancia genética entre OTUs en cada muestra, respecto de las OTUs de otras muestras (Chen et al., 2012). La matriz de distancias resultante permitió obtener la distribución de las comunidades en gráficos de Coordenadas Principales (PCoA),

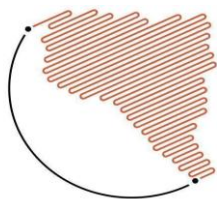
observando un agrupamiento entre las muestras de suelo y rizósfera de bodega Saldungaray, mientras que las correspondientes a suelo y rizósfera de bodega Al Este, se ubicaron más distantes, y espacialmente separadas de las anteriores (**Figura 3 A y Tabla 1A**). Sin embargo, cuando se verificó la significancia de esa aparente división en grupos mediante PERMANOVA, no se obtuvieron diferencias significativas entre muestras de suelo y rizósfera según su procedencia ($0.091 < p < 0.115$) (**Figura 3B y Tabla 1B**), lo cual podría atribuirse a la relativa cercanía entre ambas bodegas (146 km), que determinaría condicione suficientemente similares sin impacto en la diversidad de las comunidades microbianas. Se están realizando estudios tendientes a determinar la influencia del clima y del tipo y características del suelo, principales factores a tener en cuenta.

Por el contrario, las poblaciones microbianas presentes en las muestras de vino resultaron ser significativamente diferentes ($p < 0.05$) respecto a las muestras de suelo y rizósfera (independientemente de su procedencia) (**Figura 3 A y B**).



	Suelo-AE - 2017		Rz-S - 2017	Estrella: FML
	Suelo-S - 2017		Vino-S - 2017	Anillo: FA Media
	Rz-AE - 2017		Vino-S - 2018	Diamante: Mosto Mixto 2018
				Cono: Mosto 2017
				Esfera: Suelo/Rizósfera

Figura 3: Análisis de Coordenadas Principales de las comunidades microbianas (procariotas) por UniFrac no-ponderado. **A.** Profundidad de muestreo de 920, incluyendo todas las muestras de vino, suelo y rizosfera. **B.** Profundidad de muestreo de 7738, suelo y rizósfera de ambas bodegas.



A		Tamaño de Muestra	Permutaciones	p
Grupo 1	Grupo 2			
Suelo-AE	Suelo-S	6	999	0,097
	Rz-AE	6	999	0,0115
	Rz-S	6	999	0,091
	Vino-S	7	999	0,019
Suelo-S	Rz-AE	6	999	0,096
	Rz-S	6	999	0,094
	Vino-S	7	999	0,032
Rz-AE	Rz-S	6	999	0,094
	Vino-S	7	999	0,021
Rz-S	Vino-S	7	999	0,028
B		Tamaño de Muestra	Permutaciones	p
Grupo 1	Grupo 2			
Suelo-AE	Suelo-S	6	999	0,094
	Rz-AE	5	999	0,307
	Rz-S	6	999	0,094
Suelo-S	Rz-AE	5	999	0,095
	Rz-S	6	999	0,102
Rz-AE	Rz-S	5	999	0,099

Tabla 1: Análisis multivariado PERMANOVA aplicado a UniFrac – no ponderado (figura 3). **A.** Profundidad de muestreo de 920, incluyendo todas las muestras de vino, suelo y rizósfera. **B.** Profundidad de muestreo de 7738, suelo y rizósfera de ambas bodegas.

Composición taxonómica de las comunidades: La comunidad procariota asociada tanto a suelo como a rizósfera de las vides, independientemente de su procedencia, estuvo compuesta mayoritariamente por los filos bacterianos *Proteobacteria* (35,8% a 71,3% del total de OTUs), *Chloroflexi* (7,7% a 16,9%), *Actinobacteria* (4,5% a 15,1%), *Planctomycetes*, *Acidobacteria* y *Firmicutes*. Entre los filos menos abundantes, se evidenciaron *Gemmatimonadetes*, *Bacteroidetes*, *Amatimonadetes* y los candidatos *Saccharibacteria* (TM7) y *Parcubacteria* (OD1), presentes en la

mayoría de las muestras de suelo y rizósfera. Resulta interesante destacar que las arqueas están representadas de manera muy minoritaria por el *phylum Crenarchaeota*, que contabiliza solamente 0,119% del total de microorganismos. Del total de OTUs bacterianos obtenidos para cada muestra de suelo y rizósfera, entre 8,6% y 13,6% no pudieron asignarse a ningún *Phylum*. Este porcentaje se reduce en las muestras de vino, con un máximo del 4,4% en la correspondiente a FML 2017 (**Figura 4 A**). Entre las *Alphaproteobacteria*, la clase más abundante, destaca la presencia de *Rhizobiales*, con un mínimo de 20,2% y un

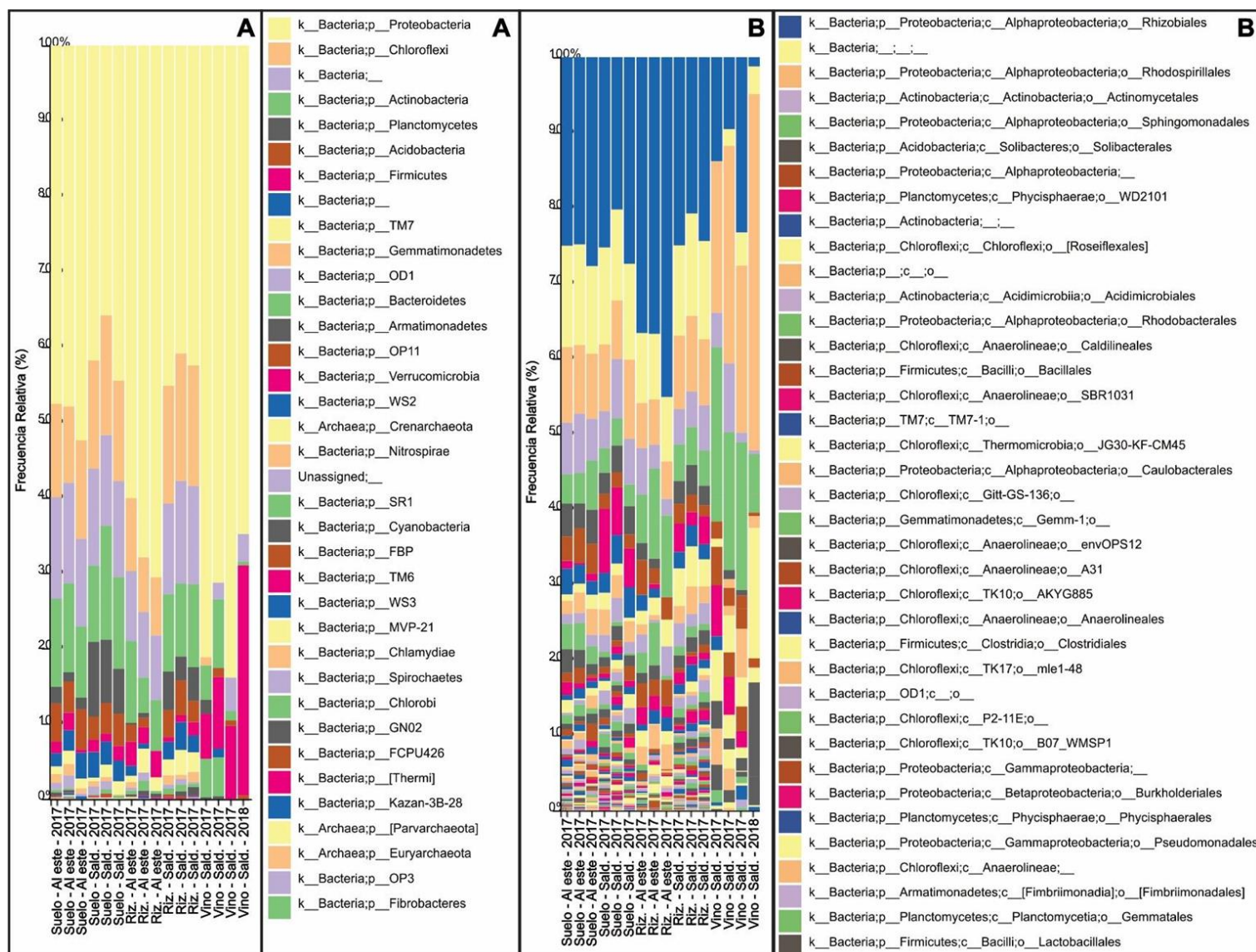
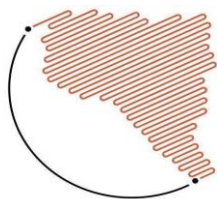
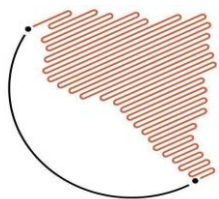


Figura 4: Abundancia relativa de las comunidades microbianas en suelo, rizósfera (AI Este y Saldungaray) y vino (Saldungaray 2017 y 2018). **A.** Nivel taxonómico: hasta Filo. **B.** Nivel taxonómico: hasta Orden (se muestran sólo los 38 más abundantes).

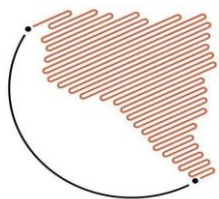
máximo de 45,1%. Miembros de este orden se reconocen por sus propiedades promotoras del crecimiento vegetal, dada su capacidad de fijación biológica de nitrógeno en leguminosas y no leguminosas. Le siguen los *Rhodospirillales* y los *Sphingomonadales* que varían entre 4,9% y 10% y entre 2,9% y 11,9%, respectivamente, en las muestras de suelo y rizósfera. En muestras de vino

resultan más abundantes (22,1% a 47,2% y 5,3% a 20% del total de OTUs en cada muestra, respectivamente). Otros autores han reportado resultados similares, analizando comunidades bacterianas de suelo y asociadas a raíces dominadas ampliamente por *Proteobacteria* spp., con presencia variable de *Acidobacteria* spp., *Bacteroidetes* spp., *Planctomycetes* spp. o



Actinobacteria spp. (Vega-Avila et al., 2014; Zarraonaindia et al., 2015; Oyuela Aguilar, 2019). En general se acepta que las características genéticas de las vides y su respuesta fisiológica al tipo de suelo en el que crecen, a las condiciones climáticas y al manejo de los viñedos son factores determinantes de las propiedades organolépticas particulares del vino que definen su *terroir*. Estudios recientes destacan la contribución de la microbiota nativa de la vid en el proceso de elaboración de vinos de una región en particular, evidenciando la existencia de patrones biogeográficos (Burns et al., 2015; Bokulich et al., 2016). Si bien estos análisis se centraron principalmente en el estudio de la microbiota de la uva, también se ha destacado la importancia del microbioma de los suelos locales en la definición del *terroir*, que también está influenciado por el clima local y las características de los viñedos. Trabajando con 5 viñedos de Long Island (Suffolk Count, NY, USA), Zarraonaindia et al. (2015) caracterizaron, en dos cosechas sucesivas del varietal Merlot, la dinámica de comunidades bacterianas asociadas a suelo, hojas, flores, uvas y raíces de la vid, demostrando que la mayoría de las OTUs bacterianas se originan en el suelo, sugiriendo su potencial como reservorio de bacterias que colonizan estas vides. También evidenciaron que los factores edáficos, el clima y las características de los viñedos influyen en la filogenia y el potencial funcional

de esta fuente de microorganismos, relacionado con roles importantes en la nutrición y sanidad vegetal. Estos autores no observaron diferencias significativas entre las comunidades bacterianas de rizósfera y de suelo de cada muestra, resultado que concuerda con los hallazgos del presente trabajo. La estructura taxonómica de las comunidades procariontas asociadas al proceso de elaboración de los vinos analizados mostró diferencias estadísticamente significativas respecto de las comunidades asociadas a suelo y rizósfera ($p < 0.05$) (**Tabla 1A**). En todas las muestras de mosto o vino el *phylum Proteobacteria* resultó ser el dominante, más específicamente las *Alphaproteobacteria* con una importante presencia de *Rhodospirillales* y *Sphingomonadales* (**Figura 4B**) que incluyen géneros potencialmente perjudiciales como *Acetobacter* o *Gluconobacter*. Grangeteau et al. (2017) observaron un notable incremento de *Gluconobacter* en vinos de fermentación orgánica, concluyendo que esto podría explicar su mayor susceptibilidad al deterioro. Si bien los vinos analizados en el presente estudio no se elaboraron de manera orgánica, este resultado evidencia la necesidad de profundizar la investigación. Es destacable también la presencia de *Firmicutes*, que aumentaron en proporción a lo largo del proceso fermentativo: 5,9% en mosto, 9,5% en FA y 9,7% en FML de las muestras Malbec 2017. Por otra parte, el



mosto mixto 2018 se diferencia especialmente, contando con un 30,5% de *Firmicutes* de total de OTUs de la muestra, a expensas de las *Actinobacteria* (0,5%) y *Proteobacteria* (64,9%) (**Figura 4A**). Resulta destacable que la población de *Firmicutes* está proporcionalmente enriquecida en *Clostridiales* (17,3%) y *Lactobacillales* (12,5%), si se compara con las restantes muestras de vino (**Figura 4B**). Estos resultados concuerdan parcialmente con lo reportado por otros autores, reafirmando la gran complejidad química y biológica de los procesos fermentativos, particularmente los espontáneos, que involucran microorganismos autóctonos (Bokulich et al., 2013; Belda et al., 2017).

Conclusiones

El presente es un análisis preliminar que contribuye al conocimiento sobre las comunidades bacterianas presentes en una región considerada re emergente para la producción vitivinícola nacional y abre posibilidades de optimización del proceso productivo a través, por ejemplo, del empleo de microorganismos nativos como iniciadores de FML o de la modificación de prácticas agrícolas capaces de incidir en las comunidades microbianas, contribuyendo a mantener la sustentabilidad de los suelos.

Referencias Bibliográficas

- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2012). The microbial ecology

of wine grape berries. *International journal of food microbiology*, 153(3), 243-259.

- Belda, I., Zarraonaindia, I., Perisin, M., Palacios, A., & Acedo, A. (2017). From vineyard soil to wine fermentation: microbiome approximations to explain the “terroir” concept. *Frontiers in microbiology*, 8, 821.

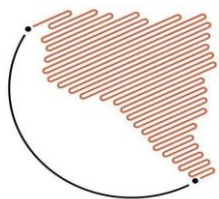
- Bokulich, N. A., Collins, T. S., Masarweh, C., Allen, G., Heymann, H., Ebeler, S. E., & Mills, D. A. (2016). Associations among wine grape microbiome, metabolome, and fermentation behavior suggest microbial contribution to regional wine characteristics. *MBio*, 7(3), e00631-16.

- Bokulich, N. A., Kaehler, B. D., Rideout, J. R., Dillon, M., Bolyen, E., Knight, R., ... & Caporaso, J. G. (2018). Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome*, 6(1), 90.

- Bokulich, N. A., Ohta, M., Richardson, P. M., & Mills, D. A. (2013). Monitoring seasonal changes in winery-resident microbiota. *PloS one*, 8(6), e66437.

- Bokulich, N. A., Thorngate, J. H., Richardson, P. M., & Mills, D. A. (2014). Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(1), E139-E148.

- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C., Al-Ghalith, G.



A., ... & Bai, Y. (2018). QIIME 2: Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science (No. e27295v1). PeerJ Preprints.

- Burns, K. N., Kluepfel, D. A., Strauss, S. L., Bokulich, N. A., Cantu, D., & Steenwerth, K. L. (2015). Vineyard soil bacterial diversity and composition revealed by 16S rRNA genes: differentiation by geographic features. *Soil Biology and Biochemistry*, 91, 232-247.

- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*, 13(7), 581.

- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*, 13(7), 581.

- Chen, J., Bittinger, K., Charlson, E. S., Hoffmann, C., Lewis, J., Wu, G. D., ... & Li, H. (2012). Associating microbiome composition with environmental covariates using generalized UniFrac distances. *Bioinformatics*, 28(16), 2106-2113.

- Citas nuevas:

- DeSantis, T. Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E. L., Keller, K., ... & Andersen, G. L. (2006). Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(7), 5069-5072.

- du Toit, M., Engelbrecht, L., Lerm, E., & Krieger-Weber, S. (2011). *Lactobacillus*: the next generation of malolactic fermentation starter cultures—an overview. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 876-906.

- Grangeteau, C., Roullier-Gall, C., Rousseaux, S., Gougeon, R. D., Schmitt-Kopplin, P., Alexandre, H., et al. (2017). Wine microbiology is driven by vineyard and winery anthropogenic factors. *Microb. Biotechnol.* 10, 354–370.

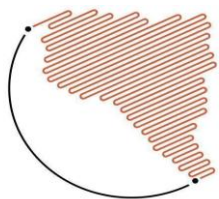
- Grimaldi, A., Bartowsky, E., & Jiranek, V. (2005). A survey of glycosidase activities of commercial wine strains of *Oenococcus oeni*. *International journal of food microbiology*, 105(2), 233-244.

- Grimaldi, A., McLean, H., & Jiranek, V. (2000). Identification and partial characterization of glycosidic activities of commercial strains of the lactic acid bacterium, *Oenococcus oeni*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51(4), 362-369.

- http://dmoserv3.who.edu/data_docs/IDP_347/FastDNA_Spin_Kit_for_Soil.pdf

- Iorizzo, M., Testa, B., Lombardi, S. J., García-Ruiz, A., Muñoz-González, C., Bartolomé, B., & Moreno-Arribas, M. V. (2016). Selection and technological potential of *Lactobacillus plantarum* bacteria suitable for wine malolactic fermentation and grape aroma release. *LWT*, 73, 557-566.

- Knight, S., Klaere, S., Fedrizzi, B., &



Goddard, M. R. (2015). Regional microbial signatures positively correlate with differential wine phenotypes: evidence for a microbial aspect to terroir. *Scientific reports*, 5, 14233.

- Kruskal, W. H., & Wallis, W. A. (1952). Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American statistical Association*, 47(260), 583-621.

- Lerm, E., Engelbrecht, L., & Du Toit, M. (2011). Selection and characterisation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* South African wine isolates for use as malolactic fermentation starter cultures. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 32(2), 280-295.

- Lozupone, C., & Knight, R. (2005). UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(12), 8228-8235.

- McDonald, D., Clemente, J. C., Kuczynski, J., Rideout, J. R., Stombaugh, J., Wendel, D., ... & Knight, R. (2012). The Biological Observation Matrix (BIOM) format or: how I learned to stop worrying and love the ome-ome. *GigaScience*, 1(1), 7.

- McDonald, D., Price, M. N., Goodrich, J., Nawrocki, E. P., DeSantis, T. Z., Probst, A., ... & Hugenholtz, P. (2012). An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *The ISME journal*, 6(3), 610.

- Mtshali, P. S., Divol, B., Van

Rensburg, P., & Du Toit, M. (2010). Genetic screening of wine-related enzymes in *Lactobacillus* species isolated from South African wines. *Journal of applied microbiology*, 108(4), 1389-1397.

- Ospital, M. S. (2003). *Vino en la pampa. La actividad vitivinícola en la provincia de Buenos Aires, 1900-1940.* *Mundo agrario*, 4(7), 0.

- Oyuela Aguilar, M. M. (2019). *Análisis de la microbiota de la vid de distintas regiones vitivinícolas y sus propiedades promotoras del crecimiento vegetal.* Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de La Plata.

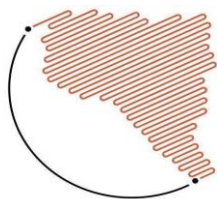
- Pedregosa, F., Varoquaux, G., Gramfort, A., Michel, V., Thirion, B., Grisel, O., ... & Vanderplas, J. (2011). Scikit-learn: Machine learning in Python. *Journal of machine learning research*, 12(Oct), 2825-2830.

- Rodriguez-r, L. M., & Konstantinidis, K. T. (2014). Estimating coverage in metagenomic data sets and why it matters. *The ISME journal*, 8(11), 2349.

- Rosenzweig, M. L. (1995). *Species diversity in space and time.* Cambridge University Press.

- Shannon, C. E., & Weaver, W. (1949). *The mathematical theory of communication.* Urbana: University of Illinois Press, 5.

- Spano, G., Rinaldi, A., Ugliano, M., Moio, L., Beneduce, L., & Massa, S. (2005). A β -glucosidase gene isolated from wine



Lactobacillus plantarum is regulated by abiotic stresses. *Journal of Applied Microbiology*, 98(4), 855-861.

- Swiegers, J. H., Bartowsky, E. J., Henschke, P. A., & Pretorius, I. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of grape and wine research*, 11(2), 139-173.

- Vega-Avila, A. D., Gumiere, T., Andrade, P. A. M., Lima-Perim, J. E., Durrer, A., Baigori, M., ... Andreote, F. D. (2014). Bacterial communities in the rhizosphere of *Vitis vinifera* L. cultivated under distinct agricultural practices in Argentina. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 107, 575–588.

- Whittaker, R. H. (1960). Vegetation of the Siskiyou mountains, Oregon and California. *Ecological monographs*, 30(3), 279-338.

- Zorraonaindia, I., Owens, S. M., Weisenhorn, P., West, K., Hampton-Marcell, J., Lax, S., ... & van der Lelie, D. (2015). The soil microbiome influences grapevine-associated microbiota. *MBio*, 6(2), e02527-14.

Agradecimientos

Agradecemos especialmente a la familia Parra, propietarios de la bodega Saldungaray, y a los encargados de gestión de bodegas Al Este, por su buena predisposición y colaboración con la toma de muestras.

Financiamiento

Universidad Nacional de Quilmes (Programa Microbiología Molecular Básica y Aplicada— Resolución (R) N° 954/17); Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC-PBA, Proyecto PITAP-BA N° 173/16); GA Rivas es becario doctoral del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.